

3/7/5

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009177259

WPI Acc No: 1992-304694/199237

Recombinant human thrombomodulin (I) deriv. - has long half life and is used as pharmaceutical

Patent Assignee: DAIICHI PHARM CO LTD (DAUC )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4210700	A	19920731	JP 90409855	A	19901212	199237 B
JP 3220174	B2	20011022	JP 90409855	A	19901212	200169

Priority Applications (No Type Date): JP 90409855 A 19901212

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

JP 4210700	A	17	C07K-013/00
------------	---	----	-------------

JP 3220174	B2	16	C07K-014/47	Previous Publ. patent JP 4210700
------------	----	----	-------------	----------------------------------

Abstract (Basic): JP 4210700 A

A recombinant human (I) deriv. in which the serine-glycine-serine-glycine-glutamine part of the 472 to 476th position of human (I) and its peripheral continuous aminoacid sequence is changed by removing, adding or replacing the amino acid and cleaved with chondroitinase ABC and made so that it can not modified by glucosaminoglucan sulphate, a plasmid pRS6M2TM-neo, Ecoli RS7M2TM-neo and a culture cell transformed by the above plasmid.

USE/ADVANTAGE - The recombinant human (I) has a longer half life than the conventional one and is useful as a pharmaceutical

Dwg.0/21

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-014/47

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00;

A61P-007/02; C12N-005/10; C12N-015/09; C12N-015/12; C12N-015/85;  
C12P-021/02; C12R-001-91

BEST AVAILABLE COPY

(51) Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 13/00		7731-4H		
A 61 K 37/02	A C B	8317-4C		
C 12 N 5/10				
		8717-4B	C 12 N 15/00	A
		7236-4B	5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数7(全17頁) 最終頁に続く

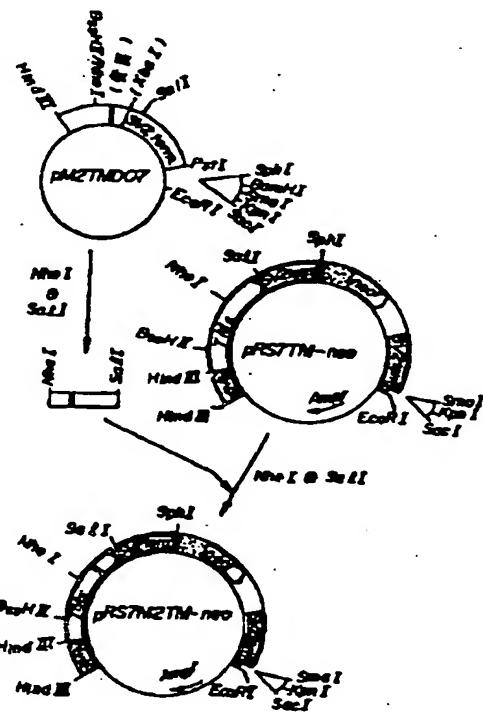
(21)出願番号	特願平2-409855	(71)出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22)出願日	平成2年(1990)12月12日	(72)発明者	坂野 勝一 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
		(72)発明者	藤原 弘之 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
		(72)発明者	杉山 則文 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
		(74)代理人	弁理士 山田 文雄 (外1名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換ヒトトロンボモジュリン誘導体

## (57)【要約】

【構成】ヒトトロンボモジュリンのアミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸周辺のアミノ酸配列が、アミノ酸の除去・付加あるいは置換により変更され、硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されなくされた組換ヒトトロンボモジュリン誘導体。この組換ヒトトロンボモジュリンの発現ベクターpRS7M2TM-neo、及びこのベクターにより形質転換され発現可能な宿主細胞。

【効果】硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されている従来の組換ヒトトロンボモジュリンに比べ、血中半減期が長く、医薬品として有用である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトトロンボモジュリンのアミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分及びその周辺の連続したアミノ酸配列が、アミノ酸を除去・付加或いは置換することにより変更され、コンドロイチナーゼABCで切断される硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されなくされた組換ヒトトロンボモジュリン誘導体

【請求項2】 ヒトトロンボモジュリンを構成する領域の内、アミノ末端領域とEGF様領域およびO-グリコシル化部位領域より成り、且つアミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分及びその周辺の連続したアミノ酸配列が、アミノ酸を除去・付加或いは置換することにより変更され、コンドロイチナーゼABCで切断される硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されなくされた組換ヒトトロンボモジュリン誘導体

【請求項3】 ヒトトロンボモジュリンを構成する領域の内、細胞膜貫通領域および細胞質内領域を欠失した領域からなり、且つアミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分及びその周辺の連続したアミノ酸配列が、アミノ酸を除去・付加或いは置換することにより変更され、コンドロイチナーゼABCで切断される硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されなくされた組換ヒトトロンボモジュリン誘導体

【請求項4】 ヒトトロンボモジュリンを構成する領域の内、N末端より1番目のアラニンより491番目のアラニンまでを含み、且つアミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分及びその周辺の連続したアミノ酸配列が、アミノ酸を除去・付加或いは置換することにより変更され、コンドロイチナーゼABCで切断される硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されなくされた組換ヒトトロンボモジュリン誘導体

【請求項5】 プラスミドpRS7M2TM-neo

【請求項6】 E.coli RS7M2TM-neo

【請求項7】 プラスミドpRS7M2TM-neoで形質転換された培養細胞

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、組換ヒトトロンボモジュリン誘導体に関するものである。さらに詳しくは、コンドロイチナーゼABCで切断されるグルコサミノグリカンによって修飾されないようにアミノ酸配列を変更することにより血中半減期が延長された組換ヒトトロンボモジュリン誘導体、その発現ベクター及びその形質転換細胞に関するものである。

## 【0002】

【発明の背景】 トロンボモジュリンは血管内皮細胞の膜

上に存在する糖蛋白の一つであり、トロンビンと結合してトロンビンの持つフィブリン凝固活性、第V因子や第VIII因子の活性化あるいは血小板活性化に対して阻害作用を示し、またトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する（実験医学 6, (14), 1396-1398 (1988); Prog. Hemost. Thromb., 9, 29-55 (1989)）。これらのトロンボモジュリンの生理活性はトロンボモジュリンが抗凝固薬として有用であることを示している。ヒトトロンボモジュリンのcDNAは既に報告され（EMBO J., 6, 1891-1897 (1987); Biochemistry, 26, 4350-4357 (1987)）、また染色体上の遺伝子のDNAについてもヒトトロンボモジュリン遺伝子はイントロンを持っていないことが判明している（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6425-6429 (1987); J. Biochem., 103, 281～285 (1988)）。Suzukiら（J. Biol. Chem., 264, 4872-4876 (1989)）はこのヒトトロンボモジュリンを遺伝子組換により動物培養細胞で生産させているが、その構造に関しては詳細な検討は行われていない。

【0003】 明らかにされたDNA配列によるとヒトトロンボモジュリンは557個のアミノ酸から成立していると推定される。ヒトトロンボモジュリンは、機能的には、アミノ末端領域、EGF様構造領域、O-グリコシル化部位領域、細胞膜貫通領域および細胞質内領域の5つの領域に分けられ、その内、EGF様構造領域が、トロンビンに作用してそのプロテインC活性化能を促進する領域であることが報告されている（J. Biol. Chem., 264, 4872-4876 (1989)）。また、アミノ末端領域、EGF様構造領域およびO-グリコシル化部位領域は細胞膜外に存在する部分であり、これらの部分だけで構成されるヒトトロンボモジュリンは細胞膜に結合できず、可溶化された形で存在する（J. Biol. Chem., 264, 4872-4876 (1989); Blood, 75, 1396-1399 (1990)）。

【0004】 本発明者らはこれら3つの領域（アミノ末端領域、EGF様構造領域およびO-グリコシル化部位領域）に着目して、これら3つの領域のみから成る組換ヒトトロンボモジュリンの生産を試みた。ヒトトロンボモジュリン遺伝子を変更し、発現ベクターを作成、さらにこれを動物培養細胞（CHO-K1細胞）に導入した発現細胞株を培養したところ、その培養液中に硫酸化グルコサミノグリカンを持った組換ヒトトロンボモジュリンを見出すことができた（特願平1-269194、国際出願PCT/JP90-01342）。この硫酸化グルコサミノグリカン構造はコンドロイチナーゼABCで切断される構造とするものであり、ヒトトロンボモジュリンでは従来知られていない構造のものであった。しかし、この硫酸化グルコサミノグリカンを有する組換ヒトトロンボモジュリンの血中半減期をラットにおいて調べたところ、約20分と短いものであった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 医薬品を疾病の治療に

使用する際、投与された医薬品の血中濃度が有効濃度を長時間にわたって維持することは極めて重要である。すなわちその期待される薬効を発揮するためには医薬品の血中半減期が十分な長さをもつていなければならない。この点は組換医薬品においても同様であり、血中半減期を長くするためにさまざまな考案がなされている。

【0006】発明者らは、硫酸化グルコサミノグリカンを有する組換ヒトトロンボモジュリンの血中半減期が短い原因として、硫酸化グルコサミノグリカンの存在に着目し、この組換ヒトトロンボモジュリンをコンドロイチナーゼABCで処理したところ、ラットにおける血中半減期は7、7時間まで延長していた。このことは、組換ヒトトロンボモジュリンに付加している硫酸化グルコサミノグリカンを除去すれば、血中半減期の長い組換ヒトトロンボモジュリンが得られることを示している。

【0007】そこで、発明者らは、前記出願で得られた組換ヒトトロンボモジュリンの硫酸化グルコサミノグリカン付加部位を調べた。すなわち、組換ヒトトロンボモジュリンを還元後遊離のSH基をカルボキシアミドメチル化し、これをトリプシンで完全消化した後、Dowex1×2によるイオン交換クロマトグラフィー及びアルコール沈澱操作を行い、硫酸化グルコサミノグリカンを含むペプチド断片を分離した。得られたペプチド断片のN末端アミノ酸配列を調べたところ、硫酸化グルコサミノグリカンの付加部位はVal·Asp·Gly·Gly·Asp·Ser·Gly·X·Gly·Glu·Pro·Pro·Proであった(Val:バリン、Asp:アスパラギン酸、Gly:グリシン、Ser:セリン、Glu:グルタミン酸、Pro:プロリン、X:特定できず)。この配列はヒトトロンボモジュリンの467番目のバリン以降の配列と一致していた。

【0008】一方、グルコサミノグリカンのペプチド鎖への結合部位周辺のアミノ酸配列に関しては、Ser'-Gly-Xaa-Gly或いは、Gly-Ser'-Glyとその近傍の酸性アミノ酸の存在が重要であることが提唱されている(Xaa:任意のアミノ酸、Ser':グルコサミノグリカンが結合するセリン)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3194-3198 (1987); J. Cell Biol., 108, 1547-1556 (1989))。またヒトトロンボモジュリンでは知られていないが、ウサギトロンボモジュリンの一部は、コンドロイチン硫酸様/デルマタン硫酸様グルコサミノグリカンで修飾されており、そのグルコサミノグリカン部分を介してアンチトロンビンIII依存性の抗トロンビン活性を示すことや、硫酸化グルコサミノグリカンの結合位置はO-グリコシル化部位領域にあるセリン・グリシン・セリン・グリシンの配列部分であることが推定されている(J. Biol. Chem., 263, 8044-8052 (1988); Thromb. Res., 54, 27-39 (1989))。

【0009】これらのことから、本発明者らは、組換ヒトトロンボモジュリンの硫酸化グルコサミノグリカン付加部位を472番目から476番目のSer·Gly·Ser·Gly·Glu

を含む領域であると予想し、この部位のアミノ酸配列を改変したところ、硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されていない組換ヒトトロンボモジュリン誘導体を作成することができた。またその血中半減期は、ラットにおいて7時間と延長されていた。本発明はこの知見に基づきなされたものであり、血中半減期が長く、抗凝固薬として有用な新規構造の組換ヒトトロンボモジュリンを提供することを目的とする。

#### 【0010】

【課題を達成するための手段】本発明の目的は、硫酸化グルコサミノグリカンの付加部位であると予想される部位(O-グリコシル化部位領域中にある472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸周辺)のアミノ酸配列を、アミノ酸の除去・付加あるいは置換により変更した組換ヒトトロンボモジュリン誘導体により達成される。

【0011】この組換ヒトトロンボモジュリン誘導体は、ヒトトロンボモジュリン遺伝子のDNAに部位特異的変異の手法を用いて、アミノ酸472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分及びその周辺の連続したアミノ酸配列をコードするDNA配列を、除去・付加あるいは置換することにより変更したヒトトロンボモジュリン誘導体遺伝子を作成し、これを用いて製造することができる。

【0012】ヒトトロンボモジュリンの遺伝子は、文献(J. Biochem., 103, 281~285 (1988))記載のDNA配列に基づいて作成できるプローブを用いてヒト染色体遺伝子より入手する。この遺伝子は完全長であってもよいし、また実施例で述べるような、アミノ末端領域、EGF様構造領域およびO-グリコシル化部位領域の3つの領域のペプチドをコードする部分長DNAでもよい。すなわちヒトトロンボモジュリンの生理活性を損なわず、かつ硫酸化グルコサミノグリカンで修飾される部位が存在する最少限の部分(おそらくはEGF様構造領域とO-グリコシル化部位領域の472番目から476番目のセリン・グリシン・セリン・グリシン・グルタミン酸部分周辺のアミノ酸配列が必要と思われる)をコードする範囲の長さのDNAであればよい。得られたヒトトロンボモジュリン誘導体の遺伝子は適当なプロモータ、ターミネータ、シグナル配列等、さらに必要に応じて適当なマークー遺伝子を付けて適当なベクターに組込まれる。ベクターは動物培養細胞で機能するものであればどのような種類のものでもよい。たとえばSV40ベクター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)ベクター、MMTV(マウス乳がんウイルス)ベクターあるいはCMV(サイトメガロウイルス)ベクターなどである。また宿主培養細胞として使用されるものは、とくに限定されないが、CHO細胞やCOS細胞はとくに適している。

【0013】以上のヒトトロンボモジュリン遺伝子の入手、発現ベクターの構築、細胞内発現等は全て慣用技術

で行なうことができる（参考「遺伝子操作マニュアル」高木康敬編著、講談社（1982）；Maniatis et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982) ; Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)）。

## \*【0014】

## 【実施例1】ヒトトロンボモジュリン遺伝子の取得

## a) プローブの作成

文献 (J. Biochem. 103, 281~285 (1988)) 記載のDNA配列に基づいて合成したDNAオリゴマーを用いてプローブを作成した。即ち、Pr-TM-01:

(5') CAGGAGCTGGCTCCGCTCCAGGAGCCTGTCCTCCTACCCCCAGC (3')

およびこれと部分的に相補鎖を形成するPr-TM-02:

(5') CAGCTGTAATGCCAGCTAACGGTCTTGGTAGCAAAGCTGGGGTGTGAG (3')

を合成した。これはヒトトロンボモジュリン遺伝子の終止コドンの13塩基下流側に相当する部分である。これら二本の合成DNAオリゴマーをアニールさせ部分的二本鎖を形成させた後、dNTPs存在下T4 DNAポリメラーゼ処理により完全二本鎖とした。このDNA断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端をリン酸化したのち、HincIIで切断したpUC119（市販）とT4 DNAリガーゼで結合させたところ前者が3個同方向に繰返し挿入されたプラスミドpUCprTM9を得た。このpUCprTM9をEcoRIおよびHindIIIで切断して合成オリゴマー由来の部分を分離し、ニックトランスレーション法により<sup>32</sup>Pでラベルし、ヒトトロンボモジュリン遺伝子取得用のプローブとして使用した。

## 【0015】b)ヒトトロンボモジュリン遺伝子のクローニング

ヒト染色体DNAをAlu I および HaeIIIで部分消化してヒト遺伝子ライブラリー（ベクターはCharon 4A）を作成し、このライブラリーから、a)に述べた方法で作成したプローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行いヒトトロンボモジュリン遺伝子をスクリーニングした（参考「遺伝子操作マニュアル」高木康敬編著 講談社（1982））。その結果、ヒトトロンボモジュリン遺伝子の全長を保持するファージクローン(phage No.7)のDNAを得た。このDNAをSac Iで切断しヒトトロンボモジュリン遺伝子を含む6.6kbpのDNA断片を分離した。このDNA断片をpUC119のSac I部位に挿入し図1上段に示すプラスミドp7TM-Sac Iを得た。図中、TMがヒトトロンボモジュリン遺伝子領域を示す。このp7TM-Sac IをXba IおよびNco Iで切断し、Klenowフラグメントを用いて平滑末端としたのちヒトトロンボモジュリン遺伝子を含む2.1kbpのDNA断片を分離してpUC119のHincII部位に挿入することにより、ヒトトロンボモジュリン遺伝子の5'側がpUC119のHindIII側にくる方向に挿入されたプラスミドp7TM01を得た（図1下段）。このプラスミドの一本鎖DNAを調製し dideoxy法によりDNA塩基配列を調べて文献 (J. Biochem. 103, 281~285 (1988)) 記載のヒトトロンボモジュリン遺伝子のDNA配列と一致することを確認した。

## 【0016】

## 【実施例2】発現ベクターの構築

図2に示すように、プラスミドp7TM01をSph IおよびPvuIIで切断し、ヒトトロンボモジュリン遺伝子の開始コドンATGを含む470bpのDNA断片を分離した。この断片をBam Iで切断後Klenowフラグメントを用いて平滑末端とし、更にBglIIで切断し、ATGコドンを含む180bpのDNA断片（断片A）を分離した。一方プラスミドp7TM01をSph Iで切断後マングビーンヌクレアーゼを用いて平滑末端化し、BglIIで切断して、ベクター部分を含む4.8kbpのDNA断片を分離した。このDNA断片と上記の断片AをT4DNAリガーゼを用いて結合させ、プラスミドp7TM17を作製した。これはp7TM01よりヒトトロンボモジュリン遺伝子の5'非コード領域をほぼ取除いたものである。なお5'側のHindIII部位までの間に残っている非コード領域は約30bpである。

【0017】次にこの全長ヒトトロンボモジュリン遺伝子にターミネータ配列を結合した。ターミネータ配列にはプラスミドpSV2-gpt（市販）のSV2ターミネータを用いた。図3に示すように、pSV2-gptをApa IおよびBam Iで切断した後Klenowフラグメントで平滑末端とし、SV2転写終了領域を含む850bpのDNA断片を分離した。この断片を、Sal Iで切断後Klenowフラグメントで平滑末端化したベクターpUC19に挿入した。転写終了領域の5'側がpUC19のEcoRI側になっている方向に挿入されたプラスミドをとり、pSVT01とした。プラスミドpSVT01をBam IおよびHindIIIで切断後マングビーンヌクレアーゼで平滑末端とし、転写終了領域を含む850bpのDNA断片を分離した。BstXIおよびXba Iで切断後マングビーンヌクレアーゼで平滑末端化したp7TM17に上記転写終了領域の断片を挿入した。ヒトトロンボモジュリン遺伝子と転写終了領域が同方向になっているプラスミドをとりp7TM19とした。

【0018】次に部分長ヒトトロンボモジュリンDNAのベクターを作成した。図4に示すように、プラスミドp7TM19をNru Iで切断後Bal31S処理し、更にXba Iを作用させた後Klenowフラグメントで末端平滑化した。これをT4DNAリガーゼでセルフライゲーションさせることによりプラスミドpTM07を得た。pTM07の保持する遺伝子によってコードされるヒトトロンボモジュリンは、1番目のアラニンから491番目のアラニンまでである（アミノ酸の番号は文献 EMBO J., 6, 1891-1897 (1987) に

よる)。

【0019】次にマーカー遺伝子のプロモータ領域を構築した(図5~7)。SV2プロモータ及びSV2ターミネータを有するプラスミドpSV2-gptをEcoRIおよびPvuIIで切断後Klenowフラグメントで平滑末端とし、キサンチシングアニン・フォスフォリボシリ・トランスフェラーゼ(GPT)遺伝子を含む2.9kbpのDNA断片をとり、これをpUC13のHincII部位に挿入した。SV2プロモータがpUC13のEcoRI側に挿入されたプラスミドをとりpDAI-gptとし(図5)、HindIII側に挿入されたものをpNAN-gptとした(図7)。プラスミドpSV2-gptをEcoRIおよびPvuIIで切断後gptを含む2.9kbpのDNA断片を分離し、EcoRIおよびSmaIで切断したpUC13と結合させた。得られたプラスミドをpTEN-gptとした(図6)。pDAI-gptをHindIIIで切断後Klenowフラグメントで平滑末端とした後SV2プロモータを含む3.0kbpのDNA断片(断片B)を分離した。pDAI-gptをBglIIおよびBamH Iで切断後Klenowフラグメントで平滑末端とした後gpt領域を含むDNA断片(1.8kbp)を分離し、断片Bと結合させた。gpt遺伝子が発現される方向に結合したプラスミドをとりpD-gptB-84とした(図5)。pD-gptB-84をXba IおよびEcoRVで切断しSV2プロモーターを含む0.8kbpのDNA断片を分離し、Xba IおよびEcoRVで切断してSV2プロモータを含む部分を取り除いたpTEN-gptに挿入した。得られたプラスミドをpT-gptB-23とした(図6)。このpT-gptB-23をHindIIIおよびEcoRVで切断しSV2プロモータを含む0.8kbpのDNA断片を分離し、HindIIIおよびEcoRVで切断してSV2プロモータ部分を取り除いたpNAN-gptに挿入した。得られたプラスミドをpN-gptB-16とした(図7)。

【0020】マーカー遺伝子としてはネオマイシン耐性遺伝子(neo')を用いた。図8に示すように、プラスミドpSV2-neo(市販)をBglIIおよびBamH Iで切断しネオマイシン耐性遺伝子を含む2.3kbpのDNA断片(断片C)を分離した。pN-gptB-16をBglIIおよびBamH Iで切断後SV2プロモータおよびアンビシリン耐性遺伝子(Amp')を含むDNA断片を分離して、断片Cと結合させプラスミドpB-neoを得た。

【0021】pB-neoをXba IとBamH IおよびSca Iで切断後マングビーンスクレアーゼで平滑末端とした後、ネオマイシン耐性遺伝子を含む2.7kbpのDNA断片を分離した(図9)。このDNA断片を、BamH Iで切断後Klenowフラグメントで平滑末端としたpTM07と結合させ、ヒトトロンボモジュリン遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子が同方向に挿入されたプラスミドpTM07-neoを得た。一方、p0-gal(文献DNA, 8, 127~133(1989))をHindIIIで切断しRSVプロモータを含む0.5kbpのDNAを分離し、この0.5kbp断片をHindIIIで切断したpTM07-neoと結合させた。プロモータがヒトトロンボモジュリン遺伝子を発現させられる方向に挿入されたプラスミドを選び、pRS7TM-neoとした。このプラスミドpRS7TM-neoを有するE.coli

RS7TM-neoは工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託番号:微工研条寄第2609号、FERM BP-2609、寄託日:1989年9月25日)。

#### 【0022】

##### 【実施例3】発現細胞株の樹立

pRS7TM-neo 20  $\mu$ gを水440  $\mu$ lに加えた後2M $\text{CaCl}_2$ 溶液60  $\mu$ l添加して1液とした。 $\times 2$  HBS液(HEPES 2.5g, NaCl 3.2g/200ml; pH7.1) 500  $\mu$ lに $\times 100$ リン酸緩衝液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.253g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.546g/100ml) 10  $\mu$ l加えたものを2液とした。2液に少量づつ1液を加えながら攪拌し、室温に30分間放置した。一方、10%FBSを添加したダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」(日本水産、以下DME②培地という)で1~2  $\times 10^5$ 個のCHO-K1細胞(大日本製薬(株)カタログ番号:03-402、原ATCC No:CCL-61)を75cm<sup>2</sup>のカルチャーポトル中で一晩培養した。新鮮な同培地10mlと交換してから4時間後上記プラスミド懸濁液を加え、18時間培養した。1g/lのG418(GIBCO社製)を含むDME②培地16mlと交換し培養を継続した。3~4日毎に培地を交換しながら10日間培養した後、限界希釈法によって形質転換株を選出することによりヒトトロンボモジュリン生産株CHO-K1RS7TMneo No.2-9b-29(以下No.2-9b-29と略す)を得た。

#### 【0023】

##### 【実施例4】活性型プロテインCの活性測定によるヒトトロンボモジュリンの定量(APC法)

33  $\mu$ lのゼラチンバッファー(0.1%ゼラチン(SIGMA社製、カタログ番号G-2500)、20mM Tris-HCl(SIGMA社製)、0.1M NaCl、0.02% NaN<sub>3</sub>; pH7.5)と、50 mM CaCl<sub>2</sub> 6  $\mu$ l、3  $\mu$ MヒトプロテインC(American Diagnostical社製)10  $\mu$ lおよび測定試料1  $\mu$ lを混合して37°Cで20分間静置した。これに3.5U/mlのウシトロンビン(持田製薬製; 5mM MES、0.1M NaCl、0.02% NaN<sub>3</sub>、pH6.0に溶解)、10  $\mu$ l添加した後37°Cで10分間静置後、20  $\mu$ lのアンチトロンビンIII(ノイアート500倍(ミドリ十字製)を20mlの生理食塩水で溶解したもの)および20  $\mu$ lのヘパリン(SIGMA社製、カタログ番号H-3125; 10,000Uを25mlのゼラチンバッファーで溶解したもの)を加える。充分に混合した後10  $\mu$ lを別の容器に移し、90  $\mu$ lのS-2366(第一化学; ゼラチンバッファーで溶解し0.11 mMとしたもの)を加えVmax(Molecular Devices社製)を用いて、ここで生成した活性型プロテインCによって起る単位時間当たりの405nmでの吸光度の変化を測定することにより測定試料中のヒトトロンボモジュリンを定量する。

#### 【0024】

【実施例5】実施例3で得られたヒトトロンボモジュリン生産CHO細胞株No.2-9b-29を1本当り $2 \times 10^7$ 個、G418(1g/l)およびアプロチニン(50U/ml)を含むGIT培地(日本製薬製)200mlの入ったローラーポトルに接種し、0.3~0.5rpmで培養を行った。2日目に上記培地で

培地交換を行った。4日目に上記培地よりG418を除いた培地と交換した。以降毎日7日目まで培地を交換し、5、6および7日目に回収した培養液を合せ生産物回収の材料とした。

## 【0025】

【実施例6】実施例5で得られた培養液(880ml)から遠心分離(3000rpm、10分間)および濾過(0.8μmメンブランフィルター使用)処理によって固体夾雑物を取り除いた後、1.0M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を添加しpHを7.5に調整した。この液を、0.15M NaClを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)で予め平衡化したQ-セファロースファーストフロー(Pharmacia社製)充填カラム(Φ2.5×12cm)に流速200ml/時で通した。カラム流量20ml/時の前記緩衝液300mlで洗った後流量100ml/時の20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)中で0.15Mから1.2Mの直線塩化ナトリウム濃度勾配を用いて溶出した(総溶出緩衝液量は1000ml)。溶出液を19mlづつ分画し各フラクションをAPC法により活性を調べた。その結果、フラクションNo.8~15と22~32の二つの活性ピークが検出された(図10参照)。後者のピーク画分を集め画分Aとした。また前者の画分は画分Bとした。

## 【0026】

カラム: フェニル5PWRP(Φ4.6×75mm, 東ソー社製)

溶媒A: 0.1% TFA-H<sub>2</sub>O (pH≈2.0)

溶媒B: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN

濃度勾配: 溶媒Bの比率を開始時10%から50分間で65%に上げた。

流速: 1 ml/分。

試料: 20μg

検出: A<sub>280nm</sub>

結果を図11に示す。TM-αはシングルピークを示した(図11(A))が、TM-βはこのような酸性の溶出条件では溶出されなかった(図11(B))。

※【0028】そこで溶出条件を下記のようなアルカリ条件に変えてHPLC分析を行なった。

カラム: フェニル5PWRP(Φ4.6×75mm, 東ソー社製)

溶媒A: 1 mM NH<sub>4</sub>OH (pH≈9.5)

溶媒B: CH<sub>3</sub>CN

濃度勾配: 溶媒Bの比率を開始時10%から50分間で65%に上げた。

流速: 1 ml/分。

試料: 80μg

検出: A<sub>280nm</sub>

図12に示すようにこの条件下では保持時間13.0分でシングルピークとして溶出され、TM-βを純化することができた。精製されたTM-α及びTM-βは何れもSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドを示していた。

【0029】TM-α及びTM-βについて、そのN末端側のアミノ酸配列をペプチドシーケンサー(Applied Biosystems社製、470A型)を用いて5番目まで調べたところ、いずれもAla-Pro-Ala-Glu-Proであった。これは文

献(EMBO J., 6, 1891~1897(1987))記載のヒトトロンボモジュリンのN末端アミノ酸配列と一致する。TM-αとTM-βのHPLCでの挙動の違いから、TM-βは酸性糖鎖が付加したものであると推測された。

【0030】なお図13はTM-βのイオン交換クロマトの溶出パターンである。その溶出条件は下記の通りである。

カラム: DEAE-NPR(Φ4.6×35mm, 2.5μm, 東ソー社製)

溶媒A: 20mM Tris-HCl(pH 7.5)

溶媒B: 1.2M NaCl - 20mM Tris-HCl(pH 7.5)

11

12

濃度勾配：5分間、溶媒Bを10%、その後50分間で10から90%に上げた  
 流速：0.8 ml/分。  
 試料：60～70 μg  
 検出：A<sub>280nm</sub>

## 【0031】

## 【実施例8】 TM-βのコンドロイチナーゼABC処理

ヒトトロンボモジュリンでは知られていないが、ウサギトロンボモジュリンの一部は、コンドロイチン硫酸様/デルマタン硫酸様グルコサミノグリカンで修飾されており、そのグルコサミノグリカン部分を介してアントロンピンIII依存性の抗トロンピン活性を示すことが報告されており、硫酸化グルコサミノグリカンの重要性が示されている(J. Biol. Chem., 263, 8044～8052 (1988); Thromb. Res., 54, 27～39 (1989))。そこで酸性物質であるTM-βについて硫酸化グルコサミノグリカンの有無を調べた。まずコンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸を特異的に分解して硫酸化不飽和二糖を生成するコンドロイチナーゼABCでTM-βを処理した。コンドロイチナーゼABC(プロテアーゼフリー、1U/バイアル；生化学工業製)凍結乾燥粉末の入ったバイアルに620 μlの0.1M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)と30 μlの1.0M酢酸ナトリウム水溶液を加え酵素を溶解した。これに、350 μlのTM-β溶液(3.4mg/ml, 0.1M NaCl-20 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5))を加えよく攪拌した後37℃\*

カラム：Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>, φ 6.0×150 mm (島津製作所製)

溶媒A：10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

溶媒B：500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

流 量：1.2 ml/分

溶出条件：試料注入後5分間は溶媒Aのみで流し、その後40分間で溶媒Bの比率を最終80%まで直線的に高めた。

検 出：232nmにおけるUV吸収

この本条件下で試料中の主要ピークの保持時間は24.7分であった(図14)。このピークを示す不飽和二糖を便宜上△Di-XSとして図面に示す。この保持時間は市販の標準2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose(以下△Di-4Sと略す；生化学工業社製)の保持時間と一致した。さらに、本試料(△Di-XS)と△Di-4Sを混合して上記条件下で分析を行うと、試料中の主要ピーク(保持時間24.7分)に相応の増加が見られた(図15)。△Di-4Sはコンドロイチン-4-硫酸やデルマタン硫酸をコンドロイチナーゼABCで処理した場合の分解産物として知られているものである。TM-βの主要修飾糖鎖はコンドロイチン-4-硫酸又はデルマタン硫酸であると推測できた。なお図14、15における保持時間16.1分のピークは試料中に混在するSCN<sup>-</sup>イオン(実施例7の操作により混入)によるピークである。

カラム：Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>, φ 6.0×150 mm (島津製作所製)

溶 媒：アセトニトリル：メタノール：0.5M醋酸アンモニウム緩衝液(pH4.8)

流 量：1.5 ml/分

検 出：232nm のUV吸収

この条件下でも試料中の主要ピークの保持時間(21.3分)は予想分解産物△Di-4Sの保持時間と一致していた(図示せず)。

## 【0035】

\*で16時間反応させた。なお TM-βの定量は、TM-αの凍結乾燥粉末を標準試料にして、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay法)により行なった。このときの重量換算は、SDS-電気泳動の泳動度から、TM-αの分子量を70kD、TM-βの分子量を85kDとして行なった。

10

## 【0032】

【実施例9】 HPLC装置(LC-6AD；島津製作所製)に装着したTSKgel Phenyl SPW RP(φ 4.6×75mm；東ソー社製)をあらかじめ流量1.0ml/分の条件下で10%CH<sub>3</sub>CNを含む1mM NH<sub>4</sub>OH溶液で平衡化しておき、この条件下で連続的に通液中のカラムに実施例8で得た反応液を注入した。この操作により大部分の蛋白質はカラムに吸着されるが、反応生成物である不飽和二糖は吸着されないで通過する。この通過画分を回収し凍結乾燥し、その凍結乾燥粉末を1.0 mlの水に溶解しHPLCによる同定の試料とした。

20

## 【0033】

【実施例10】 実施例9で得られた試料を下記の条件でHPLCによる分析を行った。

※イチナーゼABCで処理した場合の分解産物として知られているものであり、TM-βの主要修飾糖鎖はコンドロイチン-4-硫酸又はデルマタン硫酸であると推測できた。なお図14、15における保持時間16.1分のピークは試料中に混在するSCN<sup>-</sup>イオン(実施例7の操作により混入)によるピークである。

## 【0034】

【実施例11】 実施例9で得られた試料について実施例10とは異なる下記の条件でHPLCによる分析を行った。

40

カラム：Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>, φ 6.0×150 mm (島津製作所製)

溶 媒：アセトニトリル：メタノール：0.5M醋酸アンモニウム緩衝液

(pH4.8)

流 量：1.5 ml/分

検 出：232nm のUV吸収

【実施例12】 次にTM-β修飾糖鎖がコンドロイチン-4-硫酸であるのかデルマタン硫酸であるのか明らかにするため、コンドロイチナーゼAC 1フラボ(コンドロイチ

50

ン-4-硫酸を特異的に分解して硫酸化不飽和二糖を生成

するが、デルマタン硫酸は分解できない)でTM- $\beta$ を処理した。50 $\mu$ lのTM- $\beta$ 溶液(3.4mg/ml, 0.15M NaCl-20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5))に50 $\mu$ lの0.4M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)と50 $\mu$ lの0.4M酢酸ナトリウム溶液と50 $\mu$ lの0.1% BSA溶液および200 $\mu$ lの水を加え、更にこれに予め0.1% BSA溶液に1U/mlの濃度で溶かした市販コンドロイチナーゼAC1フラボ(1.6U/バイアル:生化学工業製)溶液100 $\mu$ lを添加した後よく攪拌し37°Cで6時間反応させた。得られた反応液から、実施例9と同様にして不飽和二糖画分を集め、実施例10, 11と同様の条件でHPLCにかけたところ、いずれも実施例10, 11と同様に予想分解産物 $\Delta$ Di-4Sと同じ保持時間を持つピークが観察された。図16は実施例10と同一条件下でのHPLC溶出パターンである。従ってTM- $\beta$ の修飾糖鎖はコンドロイチン-4-硫酸であると推測できた。

## 【0036】

【実施例13】さらにTM- $\beta$ の修飾糖鎖はコンドロイチン-4-硫酸であることを確認を得るため、TM- $\beta$ の予想分解産物 $\Delta$ Di-4Sに特異的に作用し脱硫酸するコンドロ-4-スルファターゼで $\Delta$ Di-4Sを処理した。実施例9で得られた試料50 $\mu$ lに10 $\mu$ lの0.4M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)と10 $\mu$ lの0.4M酢酸ナトリウム溶液と10 $\mu$ lの0.1%BSA溶液および10 $\mu$ lの水を加え、これに2 $\mu$ lの市販コンドロ-4-スルファターゼ(1U/ml 0.1%BSA:生化学工業製)を添加しよく攪拌した後37°Cで1時間反応させた。100°C 2分間加熱して反応を停止させた後ただちに実施例10に述べた条件によりHPLCを用いた分析を行った。その結果、保持時間24.7分のピークが減少し、新たに保持時間15.6分のピークが観察された(図17(C))。この保持時間は市販の標準2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-gluco-4-enepyranosyl uronic acid)-D-galactose(以下 $\Delta$ Di-0Sと略す)と一致した(図17(A))。さらに市販の $\Delta$ Di-4Sと2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-gluco-4-enepyranosyl uronic acid)-6-O-sulfato-D-galactose(以下 $\Delta$ Di-6Sと略す:生化学工業製)を各2.5 $\mu$ gづつコンドロ-4-スルファターゼで処理し同様の条件でHPLCによる分析を行った。その結果 $\Delta$ Di-4Sでは保持時間が $\Delta$ Di-0Sと等しいピークを生じた(図17(B))。しかしコンドロイチン-4-硫酸の分解産物として知られている $\Delta$ Di-6Sではコンドロ-4-スルファターゼ処理によるピークの移動は観察されなかった(図17(D))。以上の結果から本発明の組換ヒトトロンボモジュリン(TM- $\beta$ )はコンドロイチン-4-硫酸を基本とする硫酸化グルコサミノグリカンを有することが判明した。なお $\Delta$ Di-4S生成量をHPLCでのピーク面積から換算した結果、組換ヒトトロンボモジュリンからその1分子当たり平均20~25分子の上記 $\Delta$ Di-4Sがコンドロイチナーゼ処理により生成するものと推測できた。

## 【0037】

【実施例14】TM- $\beta$ の抗凝固活性の測定

540Mウシトロンビン(表1中ではTと略す)の生理食塩水溶液(持田製薬製)100 $\mu$ l、ウシフィブリノーゲン(タイプ2: 3mg/ml, 20mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.5: 第一化学薬品製)100 $\mu$ lおよび0.9% NaCl, 1mg/ml BSA, 0.1% ルブロールPXに溶解した0.54, 10あるいは1620MのTM- $\beta$ 100 $\mu$ lを混合して反応を開始し、凝固までの時間を測定した。測定は血液凝固自動測定器クロックII(メテク社製)を使用して行った。その結果は次の通りである。数値の単位は秒で示してある。

## 10 【0038】

## 【表1】

I: TM- $\beta$	1:0	1:1	1:2	1:3
凝固時間	21.0	32.3	52.5	90.0

【0039】表に示すように硫酸化グルコサミノグリカン鎖を有するヒトトロンボモジュリン、TM- $\beta$ はトロンビンの凝固活性を抑制していた。

## 20 【0040】

【実施例15】TM- $\beta$ によるトロンビンのプロテインC活性化の促進

1ml当たり20, 15, 8, 6, 4, 2及び1 $\mu$ gのTM- $\beta$ 溶液を作り、これを測定試料として実施例4の方法で活性化プロテインCを生成させた。生成した活性化プロテインCによって起こる1分間当たりの吸光度(OD<sub>405nm</sub>)変化を図18に示す。図に示すように、硫酸化グルコサミノグリカン鎖を有するヒトトロンボモジュリン、TM- $\beta$ はトロンビンによるプロテインC活性化を促進していた。

## 30 【0041】

【実施例16】コンドロイチナーゼABC処理したTM- $\beta$ の血中濃度半減期

TM- $\beta$ を実施例8と同様な方法でコンドロイチナーゼABC処理し、実施例9と同様にHPLCカラムに注入し、カラムをよく洗浄して反応生成物である不飽和二糖を除去した。次に、カラムに吸着保持されたコンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$ を1mM NH<sub>4</sub>OH-アセトニトリル(5-65%の直線濃度勾配)で溶出し、これを集めて凍結乾燥した。この凍結乾燥標品を0.9% NaCl, 0.1% ルブロールPX, 1mg/ml BSAに溶解して、以下の実験に用いた。

【0042】ウイスター系雄性ラット(静岡実験動物)11週令をペントバルビタール(商品名、ネンプタール:大日本製薬製)麻酔下で、コンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$ を0.2 mg/kgの用量で大腿静脈から投与した。投与後、5, 10, 30, 60, 120, 300分にクエン酸加血(3.13%クエン酸ナトリウム・2水塩:血液=1:9)を採取し、遠心操作(3,000 rpm, 10分)により血漿を得た。この血漿をPBS(0.02%ルブロールPX含有)で100倍希釈して、ELISAで血中のコンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$ 量を定量した。TM- $\beta$ 量の換算は実施例8と同様 TM- $\alpha$

凍結乾燥粉末を標準試料として行った。

【0043】 図19に示すように、コンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$  (-●-) の血中濃度半減期は7.7時間であり、未処理TM- $\beta$ の場合 (-○-) の血中濃度半減期約20分に比べ、著しく延長していた。なお、コンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$ は、トロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を失うことはなかった。従って、硫酸化グルコサミノグリカン鎖で修飾されないヒトトロンボモジュリン誘導体を作ることができれば、TM- $\beta$ よりも血中半減期の長い組換ヒトトロンボモジュリンとすることが期待できる。

#### 【0044】

##### 【実施例17】ヒトトロンボモジュリン誘導体遺伝子の作成とその発現ベクターの構築

部分長ヒトトロンボモジュリン遺伝子を有するプラスミドpTMs07を、BssHIIおよびNheIで切断後Klenowフラグメントで平滑末端とし、self-ligationさせ、約1.3kbのBssHII-NheI断片が除去されたプラスミドpTMDs07を得た(図20上段)。別途DNAオリゴマーMut-TMSG-2:(5')GCTCGCCAGAGTCGCCACCG(3')を合成し、Kunkel法(文献: Sambrook et al.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed." Vol.2, p15.74, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989))により部位特異的変異の手法を用いてpTMDs07に変異を導入した。実験に当たっては部位特異的変異実験キット「Mutant™-K」(宝酒造製)を使用した。即ち概略を述べると以下の通りである(図20、21)。

#### 【0045】i) dUを含むssDNAの取得

pTMDs07をE.coli NV1184に保持させ、この菌を2×YT培地(10 $\mu$ g/mlのテトラサイクリン、30 $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含む)で前培養した。この培養液30 $\mu$ lを2×YT培地(150 $\mu$ g/mlのアンビシリンを含む)3mlに接種し、ファージM13K07をm.o.i.=2~10で感染させ、37℃30分静置後70 $\mu$ g/mlとなるようにカナマイシンを加えて一夜37℃で振盪培養した。遠心分離で上清を集め0.22 $\mu$ lのメンブランフィルターで通過した後、この上清20 $\mu$ lとE.coli BW313の培養液80 $\mu$ lを混合し37℃10分間静置後適当量をLB-プレート(150 $\mu$ g/mlのアンビシリンを含む)にひろげ37℃でコロニーを形成させた。シングルコロニーを2×YT培地(150 $\mu$ g/mlのアンビシリンを含む)で前培養し、この培養液1mlを2×YT培地(150 $\mu$ g/mlのアンビシリンを含む)100mlに接種しファージM13K07をm.o.i.=2~10で感染させた。37℃30分静置後70 $\mu$ g/mlとなるようにカナマイシンを加えて一夜37℃で振盪培養した。遠心分離で上清を回収した。上清に20%PEG6000/2.5M NaCl溶液25mlを加え攪拌し、室温で10分放置後遠心分離で沈澱を集めた。TE緩衝液5mlに溶かし等量の中和フェノールを加えて攪拌後10分静置した。遠心分離で水層を回収し、等量の中和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコ

ール(25:24:1)を加えて攪拌後10分静置した。遠心分離で水層を回収し、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)を加えて攪拌後10分静置した。遠心分離後水層を回収し、3M酢酸アンモニウム、pH8.0を500 $\mu$ l、イソプロピルアルコール5mlを加えて攪拌後、遠心分離して沈澱を集めた。沈澱を70%エタノールで洗い、減圧乾燥した後50 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。

#### 【0046】ii) 部位特異的変異の導入

10 10pmolの上記合成オリゴマーMut-TMSG-2をATP存在下T4ポリヌクレオチドキナーゼによって5'末端をリン酸化(反応溶液の最終容量は10 $\mu$ l)した。この溶液1 $\mu$ lとi)で得たssDNA溶液(0.2pmol/10 $\mu$ lアニール緩衝液)1 $\mu$ lを混合し65℃15分、37℃静置することによりハイブリダイズさせた。これにdNTPs存在下E.coli DNAリガーゼ、T4 DNAポリメラーゼを加え(反応溶液27 $\mu$ l)25℃2時間静置後、3 $\mu$ lの0.2M EDTA、pH8.0を加え65℃5分静置し反応を停止させた。この反応液3 $\mu$ lをE.coli BMH71-18mutSコンピテントセルに混合し0℃30分、42℃45秒、0℃1~2分静置した後、SOC培地300 $\mu$ lを加え、37℃1時間振盪培養した。これにM13K07ファージを感染させ37℃30分静置し、2×YT培地(150 $\mu$ g/mlのアンビシリン、70 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む)1mlを加え37℃で一夜振盪培養した。遠心分離で回収した上清20 $\mu$ lをE.coli NV1184培養液80 $\mu$ lを混合し、37℃10分静置後LB-プレート(150 $\mu$ g/mlのアンビシリンを含む)にひろげ37℃でコロニーを生育させた。これより部分特異性変異の導入されたプラスミドpM2TMD07を得た(図20下段)。

20 30 【0047】pM2TMD07をNheI及びSalIで切断後変異導入部位を含む約260bpのDNA断片を分離した。この断片をpRS7TM-neoをNheI及びSalIで切断後分離したプロモーターを含むDNA断片と結合させ、欠損変異ヒトトロンボモジュリン遺伝子と発現させるためのベクターpRS7M2TM-neoを作成した(図21)。このプラスミド・ベクター-pRS7M2TM-neoを有するE.coli RS7M2TM-neoは工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託番号:微研条寄第3177号)。

#### 【0048】

40 【実施例18】実施例3と同様の方法で、pRS7M2TM-neoを用いてCHO-K1細胞を形質転換し、組換え欠損変異ヒトトロンボモジュリン誘導体(以下MTM10と称する)の発現細胞株CHO-K1RS7M2TM-neo No.14-50(以下No.14-50と略す)を得た。

#### 【0049】

【実施例19】実施例5と同様の方法で、MTM10生産細胞株No.14-50をローラーボトルで培養し、5、6及び7日に回収した培養液を合わせ生産物回収の材料とした。

50 【0050】

【実施例 20】実施例 19 で得られた培養液 (4 L) から遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) および通過 (0.45  $\mu$ m メンブランフィルター使用) 処理によって固形夾雑物を取り除いた後、1.0M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を添加し pH を 7.5 に調整した。この液を 0.15M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で予め平衡化した Q-セファロースファーストフロー (Pharmacia 社製) 充填カラム ( $\phi 5 \times 10$  cm) に流速 30ml/分で通した。カラム流量 20ml/分の前記緩衝液 200ml で洗った後流量 20ml/分の 0.5M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 600ml で溶出した。溶出画分中の MTM10 を ELISA 法 (二種類の抗ヒトトロンボモジュリン・モノクロナル抗体を用いたサンドイッチ法) で定量したところ、回収率は 99% であった。

## 【0051】

【実施例 21】実施例 20 の活性画分をアフィニティクロマトグラフィで精製した。予め 0.15M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で平衡化した抗ヒトトロンボモジュリン I g G 結合セルロファイン (ホルミルセルロファイン (チッソ社製) に抗ヒトトロンボモジュリン I g G を約 5mg/ml ゲルの割合で結合させたもの) 充填カラム ( $\phi 2.5 \times 9$  cm) に活性画分を流量 60ml/時で通した。このカラムを流量 60ml/時で 0.35M NaCl を含む 20mM \*

カラム： フェニル 5-PWRP  
( $\phi 4.6 \times 75$  mm, 東ソー社製)

溶媒 A： 0.1 % TFA-H<sub>2</sub>O

溶媒 B： 0.1 % TFA-CH<sub>3</sub>CN

濃度勾配： 溶媒 B の比率を開始時 20% から 60 分間で 60% に上げた。

流速： 1ml/分、

試料： 20  $\mu$ g

検出：  $A_{280\text{nm}}$

結果は図 22 に示すように、MTM10 はシングルピークを示した。MTM10 について、その N 末端側のアミノ酸配列をペプチドシーケンサー (Applied Biosystems 社製、470A 型) を用いて 5 番目まで調べたところ、主なものは Ala-Pro-Ala-Glu-Pro であった。これは文献 (EMBO J., 6, 1891-1897 (1987)) 記載のヒトトロンボモジュリンの N 末端アミノ酸配列と一致する。

## 【0053】

【実施例 23】MTM10 のコンドロイチナーゼ ABC 处理 MTM10 がコンドロイチン硫酸を保持しているかどうかを調べた。コンドロイチナーゼ ABC (プロテアーゼフリー、1 U/バイアル; 生化学工業製) 凍結乾燥粉末の入ったバイアルに 620  $\mu$ l の 1.0M NaCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) と 30  $\mu$ l の 0.1M 酢酸ナトリウム水溶液を加え酵素を溶解した。これに、350  $\mu$ l の MTM10 溶液 (5.0mg/ml, 0.1M NaCl-20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)) を加えよく攪拌した後 37°C で 16 時間反応させた。反応生成物と未反応の MTM10 とを、実施例 7 と同様の条件で逆相 HPLC を行なったところ、両者の保持時間は一致していた (図示せず)。このことは MTM10 は TM- $\beta$  は

\* Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で洗浄した後 60ml/時のチオシアニ酸ナトリウムを含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 400ml で溶出した。この溶出液を集め限外通過膜 (ダイアフローメンブレン YM30,  $\phi 76$  mm) を装着した限外通過装置で約 5ml に濃縮した。これに 100ml の 0.15M NaCl 含有 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を加えて再度同様に約 5ml に濃縮した。この操作を更に二度繰り返した後、 $\phi 43$  mm の限外通過膜 YM30 を用いて最終的に 22ml に濃縮した。

## 【0052】

【実施例 22】実施例 21 のようにして得られた合計 5 ロット分の MTM10 画分を合わせて (合計容量約 100ml) ゲル通過クロマトグラフィーを行った。予め PBS (1 L 中に KCl を 200mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 200mg, NaCl を 8g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O を 2.16g 含有している) で平衡化したセファクリル S-300HR (Pharmacia 社製) 充填カラム ( $\phi 5.0 \times 95$  cm) に MTM10 画分を流量 5ml/分で通した。カラム流量 5ml/分の PBS で溶出させ、溶出液を 15ml づつ分画した。41 番目から 47 番目までのフラクションを集め、40ml に濃縮した。こうして得た MTM10 の精製物について、実施例 7 と同様の方法で逆相 HPLC を行った。溶出条件は以下の通りである。

$\beta$  と異なりコンドロイチナーゼ ABC で切断されるグルコサミノグリカンで修飾されていないことを示している。

## 【0054】

## 【実施例 24】MTM10 の血中半減期

9-10 遅令のウイスター系ラット (雄、250g 前後) にペントバルビタールで麻酔後、MTM10 を投与量 1mg/kg で大腿静脈から投与した。経時的に採血し、実施例 16 と同様に ELISA 法で血中残存量を測定した。その結果 MTM10 の血中半減期は約 7 時間であった (図 23)。以上のように、TM- $\beta$  を修飾しているコンドロイチン硫酸が結合していると予想される部位のアミノ酸配列を変更することにより作製した誘導体 MTM10 は、コンドロイチナーゼ ABC で切断されるような硫酸化グルコサミノグリカンで修飾されていないため、血中半減期が長いものと考えられる。

## 【0055】

## 【実施例 25】MTM10 によるトロンビンのプロテイン C 活性化促進能

50 40, 20, 15, 10 および 5 nM の MTM10 溶液を作り、これ

を測定試料とした。この測定試料  $6\text{ }\mu\text{l}$  を、 $32\text{ }\mu\text{l}$  の緩衝液A (20mM Tris-HCl (SIGMA 社製)、0.15M NaCl、0.5 % BSA (SIGMA 社製、カタログ番号A-4378) : pH7.4)、50 mM CaCl<sub>2</sub> 6  $\mu\text{l}$ 、3  $\mu\text{M}$ ヒトプロテインC (American Diagnostic Inc. 製) 10  $\mu\text{l}$  に混合した。これに100nM ヒトトロンビン (SIGMA 社製、カタログ番号T-3010 : 緩衝液Aに溶解) 6  $\mu\text{l}$  を添加後37°Cで15分静置し、20  $\mu\text{l}$  のアンチトロンビンIII (ノイアート500倍 (ミドリ十字製) を20mlの生理食塩水で溶解後、更に緩衝液B (50mM Tris-HCl (SIGMA 社製)、0.1M NaCl、1mM CaCl<sub>2</sub> : pH8.0) で2.5倍希釈したもの) および20  $\mu\text{l}$  のヘパリン溶液 (SIGMA 社製、カタログ番号H-3125 : 4000u/ml となるようゼラチンバッファー (0.1 %ゼラチン (SIGMA 社製、カタログ番号G-2500)、20mM Tris-HCl、0.1M NaCl、0.02 %Na<sub>3</sub> : pH7.5) で濃度を調整したもの) を加えた。充分に混合した後100  $\mu\text{l}$  のS-2366 (第一化学: ゼラチンバッファーで2.0mMに調整した後緩衝液Bで0.4mMとしたもの) を加え  $V_{max}$  (Molecular Devices 社製) を用いて、ここで生成した活性型プロテインCによって起こる単位時間当たりの405nmでの吸光度の変化を測定することにより測定試料中のMTM10の補酵素活性を調べた。生成した活性化プロテインCによって起こる1分間当たりの吸光度 ( $OD_{405}$ ) の変化を図2-4に示す。図に示すように、MTM10はトロンビンによるプロテインC活性化を促進していた。

## 【0056】

## 【実施例26】MTM10の抗凝固活性の測定

54nMウシトロンビン (表2中でTと略す) の生理食塩水溶液 (持田製薬製) 100  $\mu\text{l}$ 、ウシフィブリノーゲン (タイプ2: 3mg/ml、20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、pH 7.5: 第一化学薬品製) 100  $\mu\text{l}$  および0.9 %NaCl、1 mg/ml BSA、0.1 %ルプロールPXに溶解した0、54、108あるいは162nMのMTM10溶液100  $\mu\text{l}$  を混合して反応を開始し、凝固までの時間を測定した。測定は血液凝固自動測定器クロテックII (メテク社製) を使用して行った。その結果は次の通りである。数値の単位は秒で示してある。

## 【0057】

## 【表2】

T : MTM10	1:0	1:1	1:2	1:3
凝固時間	35.0	40.5	46.0	53.4

【0058】表に示すように、MTM10はトロンビンの凝固活性を抑制していた。

## 【0059】

【発明の効果】以上のように、本発明の組換ヒトトロンボモジュリン誘導体は、硫酸化グルコサミノグリカンが付加しないようにアミノ酸配列を変更した新規構造の組

換ヒトトロンボモジュリン誘導体であり、DNA配列を改変しないで作られた従来の組換ヒトトロンボモジュリンに比べ、血中半減期が長い。一方、従来の組換ヒトトロンボモジュリンと同様、トロンビンの凝固活性を抑制する能力と、トロンビンによるプロテインC活性化に対する促進能は失われていない。従って、本発明の組換ヒトトロンボモジュリン誘導体(MTM10)は、新たな抗凝固薬として有用性が高い。

## 【図面の簡単な説明】

10 【図1】ヒトトロンボモジュリン遺伝子を含んだプラスミドp7TM01の構築図である。

【図2】5'非コード領域をほぼ取除いた全長ヒトトロンボモジュリン遺伝子を有するプラスミドp7TM17の構築図である。

【図3】全長ヒトトロンボモジュリン遺伝子にターミネータ配列が結合されているプラスミドp7TM19の構築図である。

【図4】プラスミドp7TM19より得た部分長ヒトトロンボモジュリン遺伝子を有するプラスミドpTMs07の構築図である。

【図5】プラスミドpD-gp1B-84の構築説明図である。

【図6】プラスミドpTEN-gp1B-23の構築説明図である。

【図7】プラスミドpN-gp1B-16の構築説明図である。

【図8】マーカー遺伝子であるneo'を含むプラスミドpB-neoの構築説明図である。

【図9】ヒトトロンボモジュリン発現ベクターpRS7TM-neoの構築説明図である。

30 【図10】ヒトトロンボモジュリン生産細胞の培養液のQ-セファロース・カラムクロマトグラムの溶出パターン図である。

【図11】組換ヒトトロンボモジュリンの活性物質TM- $\alpha$ 、TM- $\beta$ の酸性条件下における逆相HPLCによる溶出パターン図である。図中(A)はTM- $\alpha$ の、(B)はTM- $\beta$ の溶出パターン図を示す。

【図12】TM- $\beta$ の弱アルカリ条件下における逆相HPLCによる溶出パターン図である。

【図13】TM- $\beta$ のイオン交換クロマトグラムの溶出パターン図である。

40 【図14】TM- $\beta$ をコンドロイチナーゼABC処理して得た不飽和二糖 ( $\Delta$ Di-XS)のHPLC溶出パターン図である。

【図15】TM- $\beta$ をコンドロイチナーゼABC処理して得た不飽和二糖 ( $\Delta$ Di-XS)に、 $\Delta$ Di-4Sを混合して行なったHPLC溶出パターン図である。

【図16】TM- $\beta$ をコンドロイチナーゼAC1フラボ処理して得た不飽和二糖のHPLC溶出パターン図である。

【図17】 $\Delta$ Di-XS及び標準試料などをコンドロイチナーゼ処理したもののHPLC溶出パターン図である。

50 【図18】TM- $\beta$ によるトロンビンのプロテインC活性

化促進効果を示す図である。

【図19】コンドロイチナーゼABC処理したTM- $\beta$ および未処理TM- $\beta$ のラット血中濃度半減期を示す図である。図中、-○-は未処理TM- $\beta$ の場合、-●-はコンドロイチナーゼABC処理TM- $\beta$ の結果を示す。

【図20】部分長ヒトトロンボモジュリン遺伝子部分に部分的特異変異を導入したプラスミドpM2TMD07の構築説明図である。

【図21】ヒトトロンボモジュリン誘導体の発現ベクター-pRS7M2TM-neoの構築説明図である。

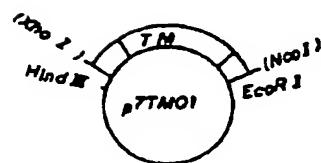
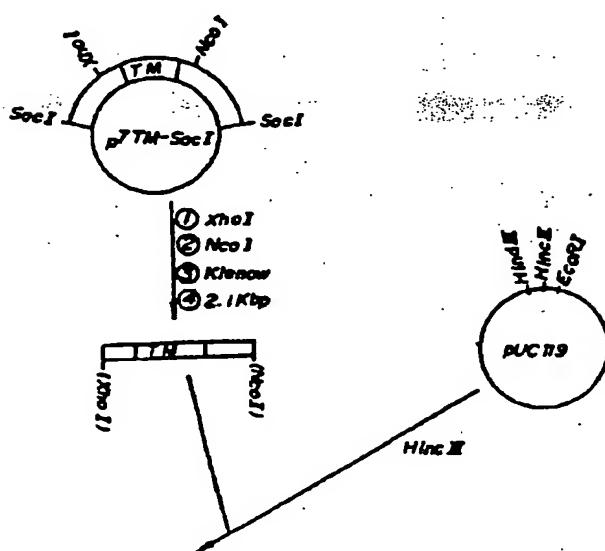
10

【図22】本発明による組換ヒトトロンボモジュリン誘導体MTM10の酸性条件下における逆相HPLCによる溶出パターン図である。

【図23】本発明による組換ヒトトロンボモジュリン誘導体MTM10のラット血中濃度半減期を示す図である。投与3分後の血中濃度を100%とした時の相対的残余量を表わしてある。

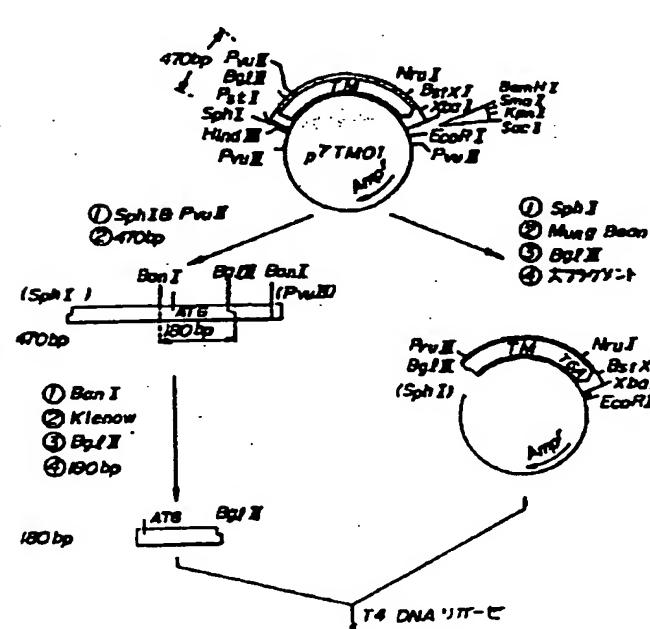
【図24】本発明による組換ヒトトロンボモジュリン誘導体MTM10によるトロンビンのプロテインC活性化促進効果を示す図である。

【図1】

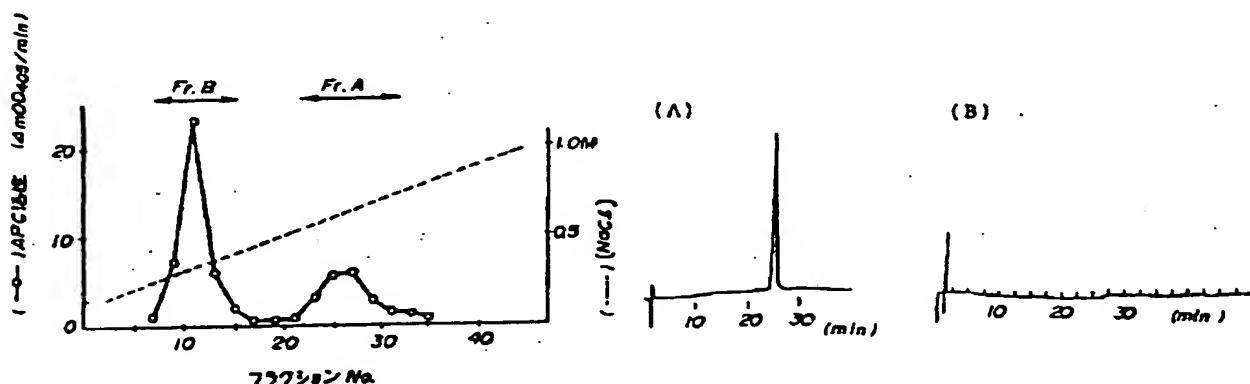


【図10】

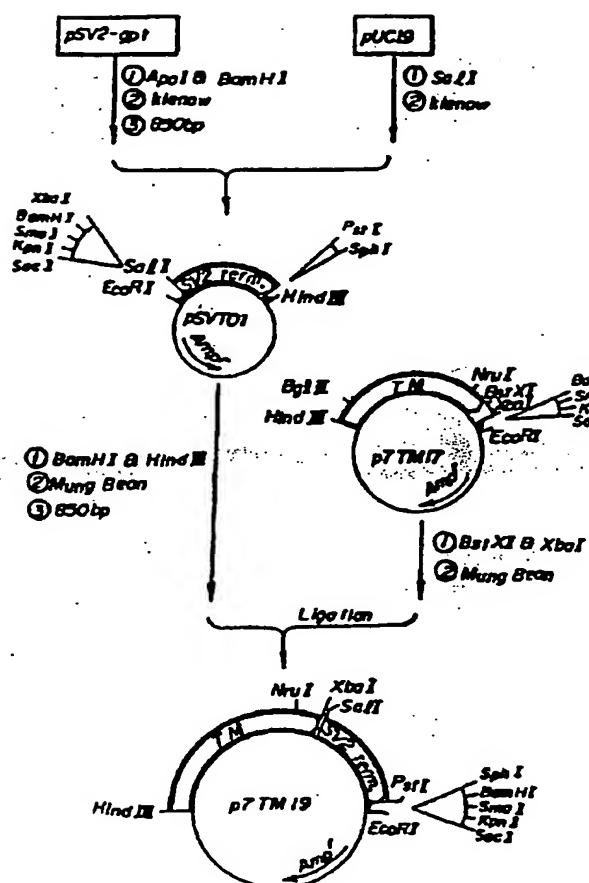
10



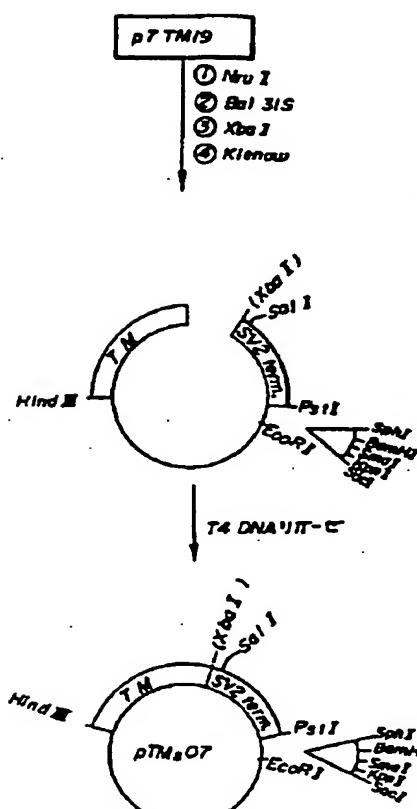
【図11】



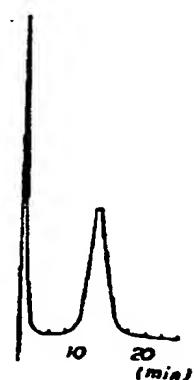
【図3】



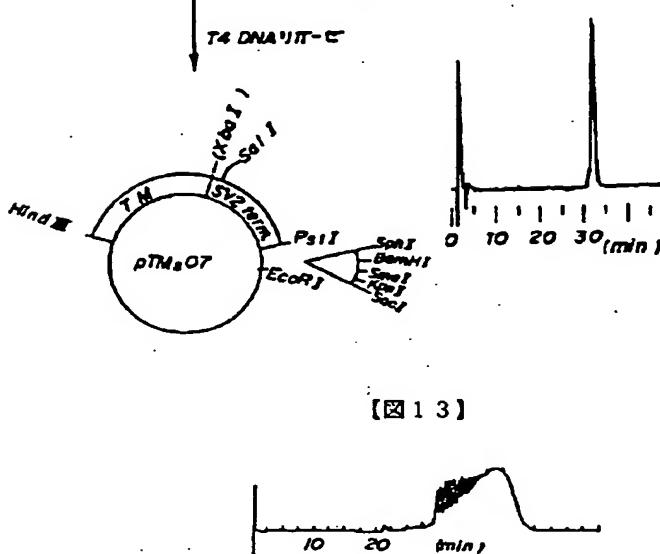
【図4】



【図12】

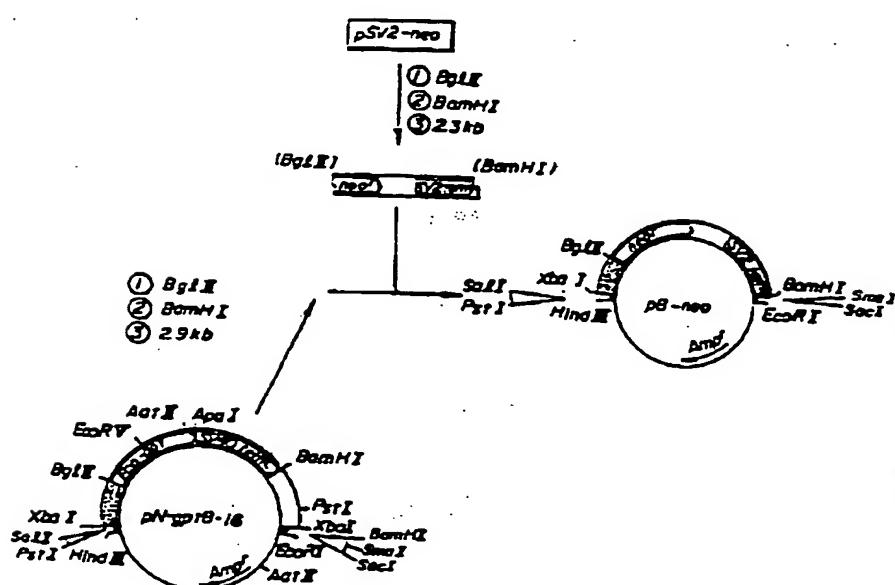


【図22】

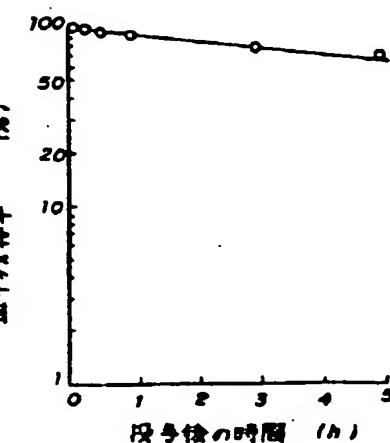


【図13】

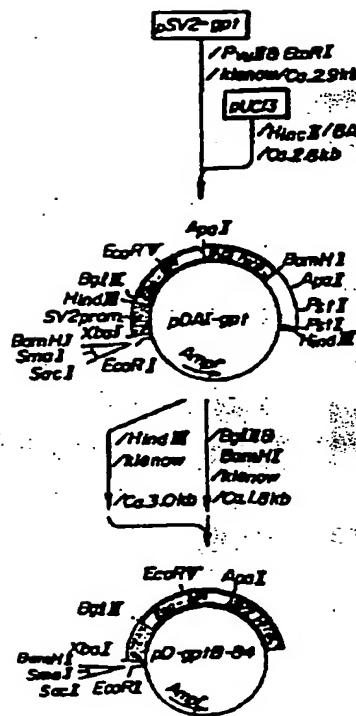
【図8】



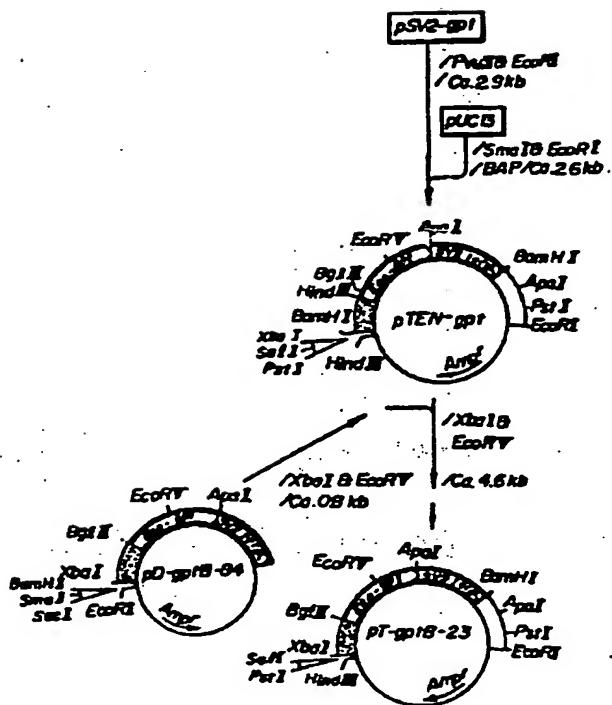
【図23】



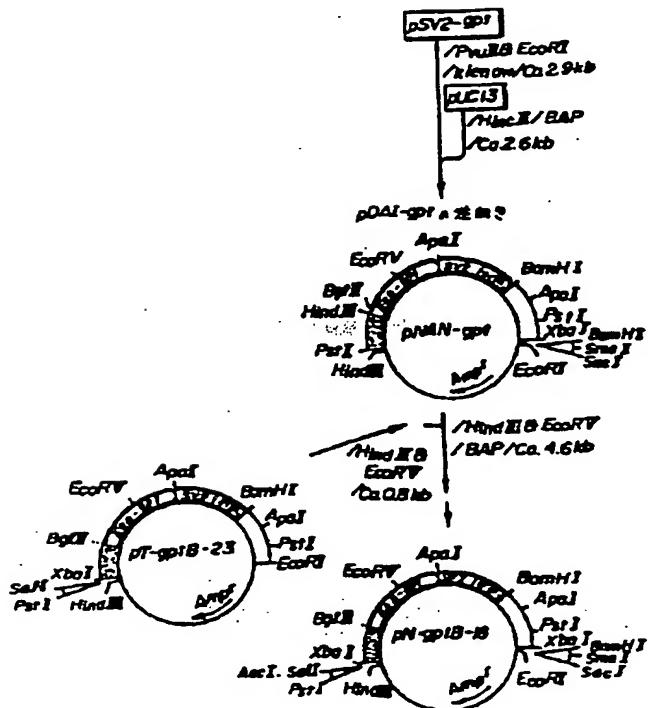
[図5]



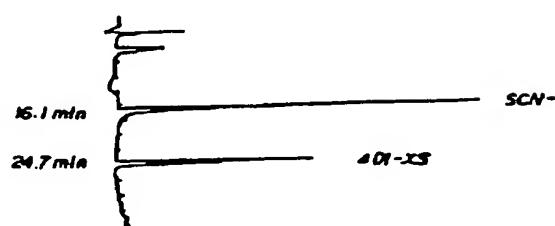
[図6]



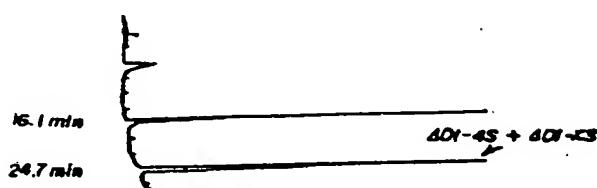
[図7]



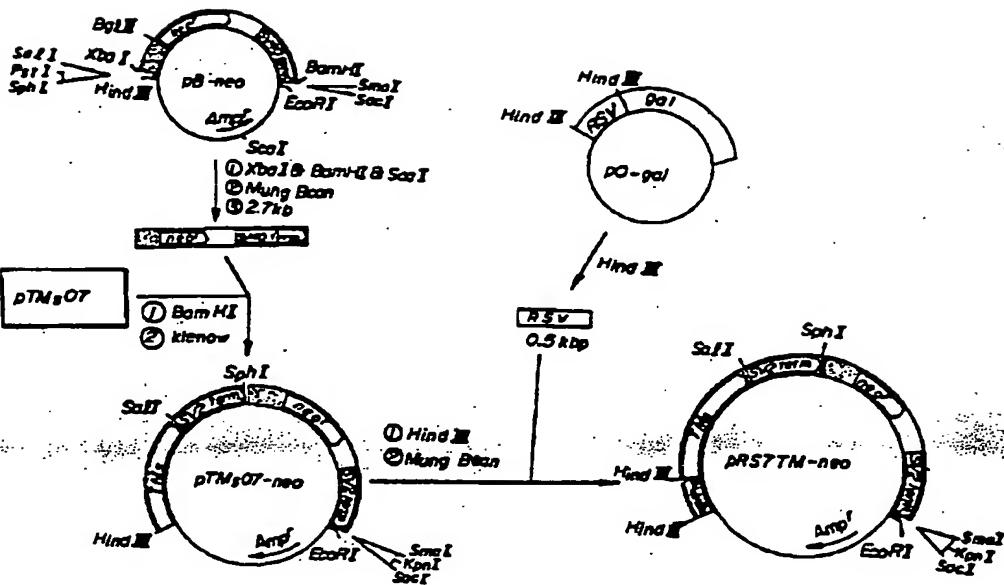
[図14]



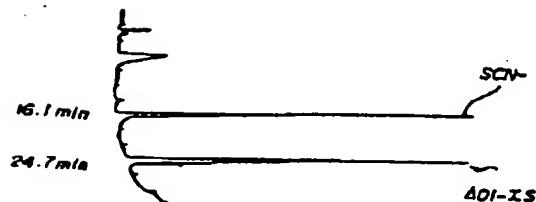
[図15]



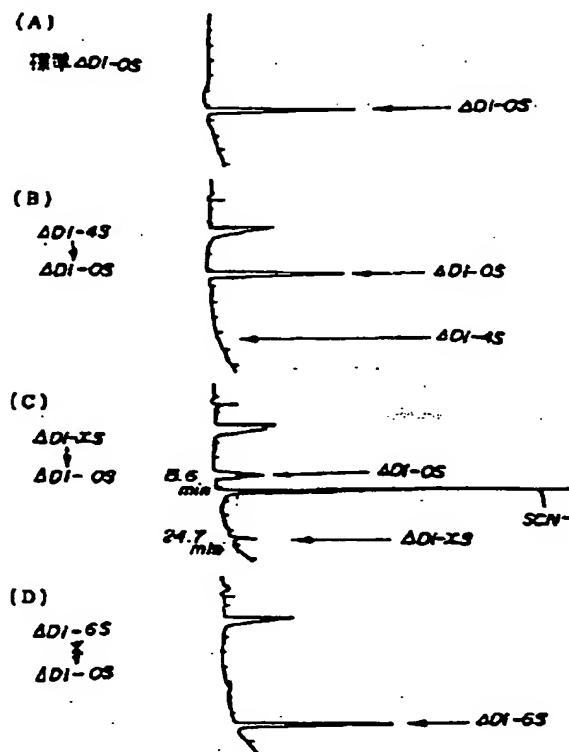
【図9】



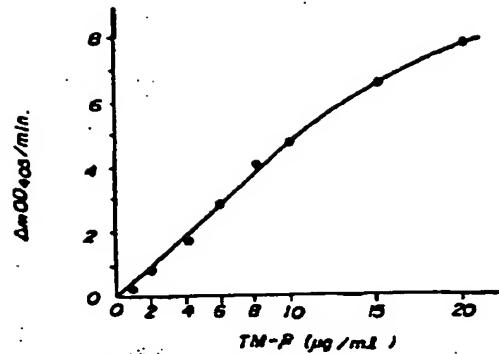
【図16】



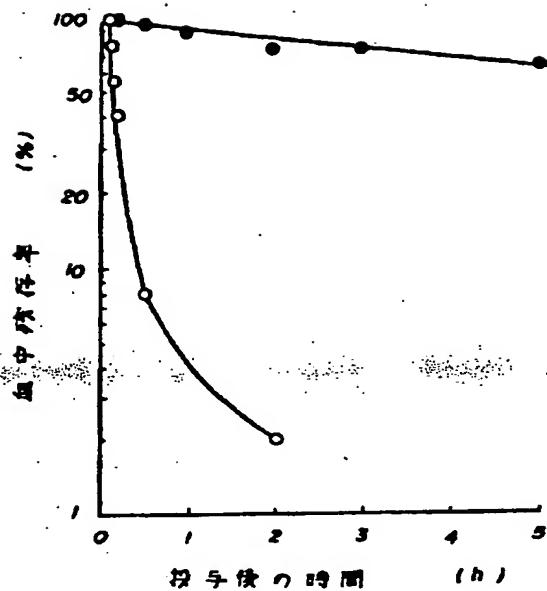
【図17】



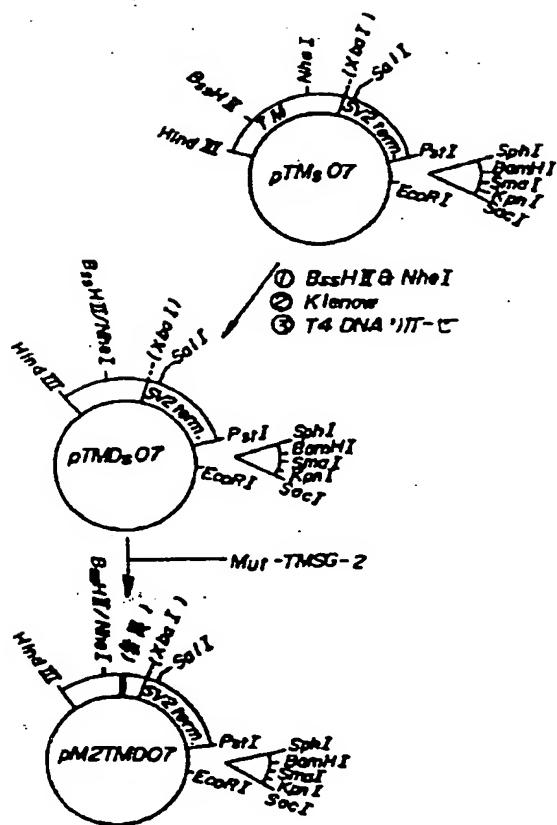
[図18]



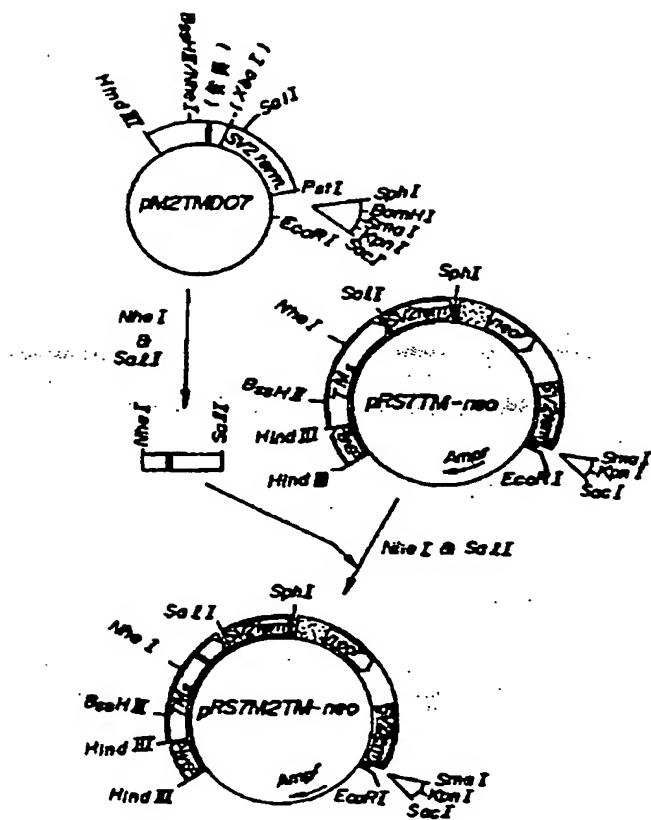
[図19]



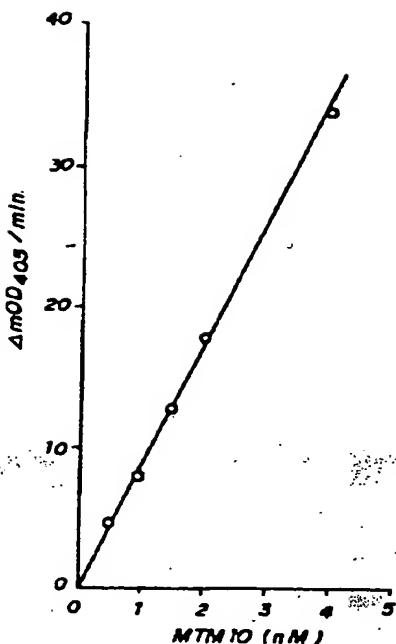
[図20]



[図21]



【図24】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
 C 12 N 15/12  
 15/85  
 C 12 P 21/02  
 // (C 12 N 5/10  
 C 12 R 1:91)  
 (C 12 N 15/85  
 C 12 R 1:91)  
 (C 12 P 21/02  
 C 12 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号  
 ZNA C 8214-4B

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 名和 克彦  
 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第  
 一製薬中央研究所内

(72) 発明者 九本 樹正  
 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第  
 一製薬中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**